

Susceptibilidad *in vitro* a antimicrobianos y producción de β -lactamasas de *Vibrio* y *Photobacterium* marinos

Z. González-Lama, S. Soria, A. Díez del Pino, M. T. Tejedor y P. Lupiola

Microbiología. Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Veterinaria. Apdo. 550.
35080 Las Palmas de Gran Canaria, España. Correo electrónico: zoilo@cicei.ulpgc.es

Recibido en julio de 1998. Aceptado en noviembre de 2000.

RESUMEN

Ha sido estudiada la actividad *in vitro* de 22 antimicrobianos frente a cuatro cepas de *Vibrio* y *Photobacterium* de origen marino. Todas las cepas son susceptibles a cloranfenicol, ácido nalidíxico, cotrimoxazol, tetraciclina, netilmicina y norfloxacin; resistentes a penicilina y ampicilina, y producen β -lactamasas. Sin embargo, hay diferencias significativas entre las cepas, especialmente en sus patrones de sensibilidad a otros antibióticos betalactámicos y aminoglicósidos. *Vibrio splendidus* biovar 1 y *Vibrio harveyi* poseen β -lactamasas pertenecientes al grupo 2d (β -lactamasas que hidrolizan la cloxacilina); *Photobacterium angustum*, β -lactamasas del grupo 2b (β -lactamasas de amplio espectro inhibidas por el ácido clavulánico); y *Photobacterium phosphoreum* var. K, β -lactamasas del grupo 2c (β -lactamasas que hidrolizan la carbenicilina y son inhibidas por el ácido clavulánico).

Palabras clave: *Vibrio*, *Photobacterium*, antimicrobianos, β -lactamasas.

ABSTRACT

In vitro* antimicrobial susceptibilities and production of β -lactamases in marine *Vibrio* and *Photobacterium

Four marine strains of *Vibrio* and *Photobacterium* were tested for their susceptibilities to 22 antimicrobial agents. All strains were susceptible to chloramphenicol, nalidixic acid, cotrimoxazole, tetracycline, netilmicin and norfloxacin; all were resistant to penicillin and ampicillin, and exhibited β -lactamase activity. However, there were significant differences between strains, especially in their patterns of betalactam and aminoglycosides susceptibility. *Vibrio splendidus* biovar 1 and *Vibrio harveyi* have β -lactamases of the 2d group (cloxacillin-hydrolyzing β -lactamases), *Photobacterium angustum* has β -lactamases of the 2b group (broad-spectrum β -lactamases inhibited by clavulanic acid), and *Photobacterium phosphoreum* var. K has β -lactamases of the 2c group (carbenicillin-hydrolyzing β -lactamases inhibited by clavulanic acid).

Key words: *Vibrio*, *Photobacterium*, antimicrobial agents, β -lactamases.

INTRODUCCIÓN

Algunas especies de *Vibrio* y *Photobacterium* de origen marino pueden producir infecciones en el hombre (Blake *et al.*, 1979; Larsen, Farid y Dalsgaard, 1981; Vartian y Septimus, 1990;

Carnahan *et al.*, 1994; Fraser *et al.*, 1997) y en algunas especies de animales marinos (Crosa, Hodges y Schiewe, 1980; Love *et al.*, 1981; Tison *et al.*, 1982; Valla *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1996).

Ciertas cepas de *Vibrio cholerae*, el agente patógeno más representativo de esta familia, muestran re-

sistencia a ampicilina y otros antibióticos (Sengupta *et al.*, 1992; Urassa, Lyamuya y Mhalu, 1997; Vijayalakshmi, Rao y Badrinath, 1997); esta resistencia suele estar mediada por plásmidos (Porazikova, Michalus y Krcmery, 1978; Reid y Amyes, 1986; Olukoya, Ogunjimi y Abaelu, 1995) y transposones (Johnson y Romig, 1979a,b).

En el ambiente marino, la transferencia de resistencia a antibióticos entre cepas pertenecientes a la misma familia es relativamente fácil, de ahí la importancia de conocer los patrones de resistencia que presentan las diferentes especies de la familia Vibrionaceae, tanto patógenas como saprofitas de origen marino, ya que estas últimas pueden actuar como reservorios de genes de resistencia a los antibióticos.

En este trabajo se estudia la susceptibilidad frente a 22 antimicrobianos que presentan cuatro cepas de origen marino pertenecientes a las especies *Photobacterium phosphoreum* var. K, *Photobacterium angustum*, *Vibrio splendidus* biovar 1 y *Vibrio harveyi*, y la producción por las mismas de β -lactamasas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las cepas objetivo de este trabajo, pertenecientes a la familia Vibrionaceae, han sido aisladas a partir de agua de mar (*Photobacterium phosphoreum* var. K y *Vibrio harveyi*) de la playa de las Canteras (Las Palmas de Gran Canaria, islas Canarias), de la superficie del pez *Sarpa salpa* (Linnaeus, 1758) (*Vibrio splendidus* biovar 1) y de su contenido intestinal (*Photobacterium angustum*). Estos microorganismos han sido clasificados de acuerdo con las directrices del manual de Bergey (Holt *et al.*, 1994) y los criterios expuestos por Baumann *et al.* (1983).

Para poner de manifiesto la susceptibilidad *in vitro* de estas cepas a los distintos antimicrobianos se han realizado una serie de antibiogramas en medio de Mueller-Hinton siguiendo la técnica disco-placa de difusión en agar (Bauer *et al.*, 1966) y, para su interpretación, las recomendaciones de National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (anónimo, 1994). Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se han obtenido por el método estándar de dilución descrito por Woods y Washington (1995).

Con polvo valorado de los diferentes antibióticos se prepararon soluciones madre y, a partir de ellas, diluciones en tubo con medio de cultivo líquido, ob-

teniendo concentraciones finales desde 0,06 mg/l hasta 128 mg/l. Por último, se inoculaban todos los tubos, incluyendo un tubo de control sin antibiótico, con la cepa bacteriana cuya CMI se pretendía calcular. Tanto para el antibiograma disco-placa como para la determinación de las CMI se ha utilizado la cepa de control *Escherichia coli* ATCC 25922, procedente de American Type Culture Collection junto con las cepas de *Vibrio* y *Photobacterium*.

La producción de β -lactamasas se ha puesto de manifiesto utilizando el método cromogénico con cefalosporina cromógena Nitrocefina (O'Callahan *et al.*, 1972). Los isoenzimas de β -lactamasas se han separado por isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida. A partir de extractos enzimáticos de las cepas productoras de β -lactamasas se ha realizado un isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida con un gradiente de pH: 3,5-8,5. Una vez realizado el isoelectroenfoque, los isoenzimas de β -lactamasas se ponen de manifiesto utilizando una solución de la cefalosporina cromógena Nitrocefina (Figuerola *et al.*, 1983).

Los perfiles de sustrato, y sus hidrólisis relativas por las β -lactamasas, se determinaron por el método espectrofotométrico-acidimétrico, que consiste en un estudio de las cinéticas de hidrólisis de los distintos antibióticos por los extractos enzimáticos de las cepas de *Photobacterium* y *Vibrio* productoras de β -lactamasas. Como indicador se utiliza el rojo fenol, la absorbancia se mide a 560 nm y los resultados se expresan como actividad específica. Una vez calculadas las actividades específicas para todos los sustratos que se desea analizar, se asigna un valor hipotético de 100 % a la actividad hidrolítica obtenida utilizando la penicilina G como sustrato y refiriendo las restantes actividades a este valor (Shannon y Phillips, 1980). Como inhibidores de β -lactamasas se usaron el ácido clavulánico y el p-cloromercuriobenzoato.

Los discos con las cargas estándar de antibióticos utilizados fueron los de Laboratorios Difco (Detroit, USA). Para el cálculo de las CMI los antibióticos fueron suministrados, como sustancias valoradas, por los distintos laboratorios farmacéuticos encargados de su comercialización.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En un trabajo previo (González-Lama y Díez del Pino, 1996) se han estudiado las bacterias biolumi-

niscentes en la costa de Gran Canaria. De las cuatro cepas objetivo de este estudio, dos emiten luz (*Vibrio splendidus* biovar 1 y *Vibrio harveyi*) y las otras dos no (*Photobacterium phosphoreum* var. K y *Photobacterium angustum*). *P. phosphoreum* var. K es un mutante espontáneo, obtenido en el laboratorio a partir de una cepa de *Photobacterium phosphoreum* que ha perdido la capacidad de emitir luz.

Las cuatro cepas son sensibles a cloranfenicol, ácido nalidíxico, cotrimoxazol, tetraciclina y norfloxacin. Estos resultados concuerdan con los encontrados por otros autores cuando estudian la susceptibilidad de estos antibióticos frente a vibrios halófilos, tanto de origen humano como ambiental, y encuentran que todas las cepas, o la mayoría de ellas, son sensibles a cloranfenicol, ácido nalidíxico, cotrimoxazol, tetraciclina, norfloxacin y otras quinolonas (Joseph, DeBell y Brown, 1978; Larsen y Farid, 1980; Morris, Tenney y Drusano, 1985; French *et al.*, 1989; French, 1990; Liu, Lee y Chen, 1997).

Como se observa en las tablas I y II, las CMI que presentan las cuatro cepas de *Photobacterium* y *Vibrio* varían de una a otra, presentando distintos patrones de resistencia a los antibióticos betaláctamicos

y aminoglicósidos. En la tabla I, todas las cepas tienen en común ser resistentes a penicilina y ampicilina y sensibles a cefotaxima; resultados similares han sido publicados por French *et al.* (1989) y Joseph, DeBell y Brown (1978) en vibrios halófilos.

Las cuatro cepas son productoras de β -lactamasas, y éstas son inhibidas por el ácido clavulánico. El p-cloromercuriobenzoato inhibió las β -lactamasas de *Photobacterium phosphoreum* var. K y las de *Photobacterium angustum*, pero no las de *Vibrio splendidus* biovar 1 y *Vibrio harveyi*. Los isoenzimas de β -lactamasas encontrados fueron: en *Vibrio splendidus* biovar 1, *Vibrio harveyi* y *Photobacterium phosphoreum* var. K, uno de punto isoeléctrico 4,9; en *Photobacterium angustum*, uno de punto isoeléctrico 6,2.

De acuerdo con sus perfiles de sustrato (tabla III), y siguiendo los criterios de clasificación de β -lactamasas de Bush, Jacoby y Medeiros (1995), las β -lactamasas de *Vibrio splendidus* biovar 1 y *Vibrio harveyi* pueden ser encuadradas dentro del grupo 2d: β -lactamasas que hidrolizan la cloxacilina; las de *Photobacterium angustum*, dentro del grupo 2b: β -lactamasas de amplio espectro inhibidas por el ácido clavulánico; y las de *Photobacterium phosphoreum* var. K, como del grupo 2c: β -lactamasas que hi-

Tabla I. Concentraciones mínimas inhibitorias de antibióticos betalactámicos (mg/l) para estirpes de *Photobacterium* y *Vibrio*. (R): resistente; (I): intermedio; (S): sensible.

	<i>P. phosphoreum</i> var. K		<i>P. angustum</i>		<i>V. splendidus</i> 1		<i>V. harveyi</i>	
Penicilina G	> 128	(R)	> 128	(R)	> 128	(R)	> 128	(R)
Cloxacilina	0,25	(S)	> 128	(R)	> 128	(R)	> 128	(R)
Ampicilina	32	(R)	32	(R)	64	(R)	> 128	(R)
Carbenicilina	64	(R)	0,25	(S)	32	(R)	64	(R)
Cefaloridina	0,125	(S)	16	(I)	8	(I)	16	(I)
Cefalotina	0,125	(S)	128	(R)	32	(R)	64	(R)
Cefuroxima	0,125	(S)	64	(R)	64	(R)	128	(R)
Cefamandol	0,125	(S)	128	(R)	16	(I)	16	(I)
Cefoxitina	1	(S)	32	(R)	4	(S)	64	(R)
Cefotaxima	0,06	(S)	1	(S)	0,25	(S)	2	(S)

Tabla II. Concentraciones mínimas inhibitorias de antibióticos aminoglicósidos (mg/l) para estirpes de *Photobacterium* y *Vibrio*. (R): resistente; (S): sensible.

	<i>P. phosphoreum</i> var. K		<i>P. angustum</i>		<i>V. splendidus</i> 1		<i>V. harveyi</i>	
Estreptomina	0,125	(S)	> 128	(R)	> 128	(R)	> 128	(R)
Gentamicina	0,250	(S)	32	(R)	2	(S)	8	(S)
Dibekacina	0,500	(S)	32	(R)	0,5	(S)	8	(S)
Tobramicina	0,500	(S)	128	(R)	8	(S)	32	(R)
Netilmicina	0,500	(S)	0,250	(S)	1	(S)	1	(S)
Kanamicina	0,125	(S)	> 128	(R)	16	(S)	32	(R)
Amikacina	0,125	(S)	128	(R)	8	(S)	64	(R)

Tabla III. Perfiles de sustrato de las β -lactamasas de las cepas de *Vibrio* y *Photobacterium*. Niveles relativos de hidrólisis considerando como 100 la hidrólisis de la penicilina G.

	<i>P. phosphoreum</i>	<i>P. angustum</i>	<i>V. splendidus</i> 1	<i>V. harveyi</i>
Penicilina G	100	100	100	100
Cloxacilina	0	16	66	154
Ampicilina	96	150	131	151
Carbenicilina	62	13	46	53
Cefaloridina	0	29	36	66
Cefalotina	15	133	66	133
Cefuroxima	11	50	0	205
Cefamandol	0	14	34	51
Cefoxitina	38	0	12	133
Cefotaxima	15	16	24	0
Ceftazidima	0	50	0	0

drolizan la carbenicilina y son inhibidas por el ácido clavulánico. Esta β -lactamasa tiene el mismo punto isoelectrónico que la β -lactamasa SAR-1 descrita en *Vibrio cholerae* por Reid y Amyes (1986) y que, además, se encuentra en el mismo grupo 2c. Para una caracterización más profunda de estas β -lactamasas se requieren estudios más complejos que serán objetivo de otro trabajo.

Como se observa en la tabla II, *Photobacterium phosphoreum* var. K es sensible a todos los antibióticos aminoglicósidos; así mismo, se puede ver la sensibilidad que presenta esta cepa, al igual que *Vibrio splendidus* biovar 1 y *Vibrio harveyi*, a la gentamicina. La sensibilidad a la gentamicina ha sido también descrita por otros autores en vibrios (Joseph, DeBell y Brown, 1978; Larsen y Farid, 1980; French *et al.*, 1989; French, 1990; Vijayalakshmi, Rao y Badrinath, 1997).

Por último, debemos destacar la alta resistencia que presenta esta cepa de *Photobacterium angustum* a los antibióticos, tanto betalactámicos (tabla I) como aminoglicósidos (tabla II); a esta cepa, que es de origen intestinal, los genes de resistencia a estos antibióticos, posiblemente, le hayan sido transferidos por otras cepas de especies que comparten el mismo hábitat.

BIBLIOGRAFÍA

- Anónimo. 1994. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. *Fifth Informational Supplement* M 100-55 14 (16). National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Villanova, PA. EE UU.
- Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris y M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496.
- Baumann, P., L. Baumann, M. J. Woolkalis y S. S. Bang. 1983. Evolutionary relationship in *Vibrio* and *Photobacterium*: A basis for a natural classification. *Ann. Rev. Microbiol.* 37: 369-398.
- Blake, P. A., M. Merson, R. E. Weaver, D. G. Hollis y P. C. Heublein. 1979. Disease caused by a marine *Vibrio*. *N. Engl. J. Med.* 300: 1-5.
- Bush, K., G. A. Jacoby y A. A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamasas and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1211-1233.
- Carnahan, A. M., J. Harding, J. Watsky y S. Hausman. 1994. Identification of *Vibrio hollisae* associated with severe gastroenteritis after consumption of raw oysters. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1805-1806.
- Crosa J. H., L. L. Hodges y M. M. Schiewe. 1980. Curing of a plasmid is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* 27: 897-902.
- Figueroa, F., Z. González-Lama, R. H. López-Orge y A. Sierra. 1983. Polyacrylamide gel electrofocusing of beta-lactamasas from *Proteus mirabilis*. En: *Electrophoresis '82. Advanced methods. Biochemical and Clinical applications*. D. Starthakos (ed.): 477-480. Walter de Gruyter and Co. Berlín; New York.
- Fraser, S. L., B. K. Purcell, B. Jr. Delgado, A. E. Baker y A. C. Whelen. 1997. Rapidly fatal infection due to *Photobacterium (Vibrio) damsela*. *Clin. Infect. Dis.* 25: 935-936.
- French, G. L. 1990. Antibiotics for marine *Vibrios*. *Lancet* 336: 568-569.
- French, G. L., M. L. Woo, Y. W. Hui y K. Y. Chan. 1989. Antimicrobial susceptibilities of halophilic *Vibrios*. *J. Antimicrob. Chemother.* 24: 183-194.
- González-Lama, Z. y A. Díez del Pino. 1996. Bacterias bioluminiscentes marinas en la costa de Gran Canaria. *Boletín. Instituto Español de Oceanografía* 12 (2): 139-144.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley y S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9.^a ed.: 256-274. Williams and Wilkins. Baltimore, EE UU.
- Johnson, S. R. y W. R. Romig. 1979a. Transposon-facilitated recombination in *Vibrio cholerae*. *Mol. Gen. Genet.* 170: 93-101.

- Johnson, S. R. y W. R. Romig. 1979b. *Vibrio cholerae* hybrid sex factor that contains ampicillin transposon Tn1. *J. Bacteriol.* 137: 531-536.
- Joseph, S. W., R. M. DeBell y W. P. Brown. 1978. *In vitro* response to chloramphenicol, tetracycline, ampicillin, gentamicin, and beta-lactamase production by halophilic *Vibrios* from human and environmental sources. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 244-248.
- Larsen, J. L. y A. F. Farid. 1980. *In vitro* antibiotic sensitivity testing of *Vibrio alginolyticus*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 88: 307-310.
- Larsen, J. L., A. F. Farid e I. Dalsgaard. 1981. A comprehensive study of environmental and human pathogenic *Vibrio alginolyticus* strains. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg.* 251: 213-222.
- Lee, K. K., S. R. Yu, F. R. Chen, T. I. Yang y P. C. Liu. 1996. Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Curr. Microbiol.* 32: 229-231.
- Liu, P. C., K. K. Lee, S. N. Chen. 1997. Susceptibility of different isolates of *Vibrio harveyi* to antibiotics. *Microbios* 91: 175-180.
- Love, M., D. Teebken-Fischer, J. E. Hose, J. J. Farmer, F. W. Hickman y G. R. Fanming. 1981. *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chomis punctipinnis*. *Science* 214: 1139-1140.
- Morris, J. G. Jr., J. H. Tenney y G. L. Drusano. 1985. *In vitro* susceptibility of pathogenic *Vibrio* species to norfloxacin and six other antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 442-445.
- O'Callahan, C., A. Morris, S. M. Kirby y A. M. Shingler. 1972. Novel method for detection of beta-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1: 283-288.
- Olukoya, D. K., A. A. Ogunjimi y A. M. Abaelu. 1995. Plasmid profiles and antimicrobial susceptibility patterns of *Vibrio cholerae* O1 strain isolated during a recent outbreak in Nigeria. *J. Diarrhoeal Dis. Res.* 13: 118-121.
- Porazikova, T., M. Michalus y V. Krcmery. 1978. R plasmids in vibronaceae-beta-lactamases in *Vibrio cholerae* (NAG-Heiberg II) and *A. hydrophyla*. *Zentralbl. Bakteriolog.* 242: 481-486.
- Reid, A. J. y S. G. Amyes. 1986. Plasmid penicillin resistance in *Vibrio cholerae*: identification of new beta-lactamase SAR-I. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 245-247.
- Sengupta, T. K., K. Chaudhuri, S. Majumdar, A. Lohia, A. N. Chatterjee y J. Das. 1992. Interaction of *Vibrio cholerae* cells with beta-lactam antibiotics: emergence of resistant cells at a high frequency. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 788-795.
- Shannon, K. y J. Phillips. 1980. Beta-lactamase detection by three simple methods: intralactam, nitrocefin and acidimetric. *J. Antimicrob. Chemother.* 6: 617-621.
- Tison, D. L., M. Nishibuchi, J. D. Greenwood y R. J. Seidler. 1982. *Vibrio vulnificus* biogroup 2: new biogroup pathogenic for eels. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 640-646.
- Urassa, W., E. Lyamuya y F. Mhalu. 1997. Recent trends on bacterial resistance to antibiotics. *East Afr. Med. J.* 74: 129-133.
- Valla, S., K. Frydenlund, D. H. Coucheron, K. Haugan, B. Johansen, T. Jorgensen, G. Knudsen y A. Strom. 1992. Development of a gene transfer system for curing of plasmids in the marine fish pathogen *Vibrio salmonicida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1980-1985.
- Vartian, C. V. y E. J. Septimus. 1990. Osteomyelitis caused by *Vibrio vulnificus*. *J. Infect. Dis.* 161: 363.
- Vijayalakshmi, N., R. S. Rao y S. Badrinath. 1997. Minimum inhibitory concentration (MIC) of some antibiotics against *Vibrio cholerae* O139 isolates from Pondicherry. *Epidemiol. Infect.* 119: 25-28.
- Woods, G. L. y J. A. Washington. 1995. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. En: *Manual of Clinical Microbiology*. Murray et al. (eds.) 6.^a ed.: 1327-1341. ASM Press. Washington D. C., EE UU.